

Dihydroxyazobenzene 系誘導体の静菌状態 溶連菌による Streptolysin-S 産生能に及ぼす 影響に就ての検索 (第2報)*

金沢大学医学部薬理学教室 (主任：岡本肇教授)
(金沢大学結核研究所化学部：越村三郎助教授)

姫 野 保 徳

(受付：昭和29年11月15日)

Yasunori HIMENO : EXPERIMENTS ON THE INFLUENCE OF VARIOUS DERIVATIVES IN THE DIHYDROXYAZOBENZENE SERIES UPON THE PRODUCTION OF STREPTOLYSIN-S BY *STREPTOCOCCUS HEMOLYTICUS* IN THE RESTING CELL SYSTEM (PART II.)

Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Kanazawa University.

(Director : Prof. Hajime OKAMOTO)

(Department of Chemistry, Research Institute of Tuberculosis, Kanazawa

University : Assist.-Prof. Saburo KOSHIMURA)

(Received for publication : Nov. 15, 1954.)

1939年岡本教授によつて「核酸による溶連菌の溶血毒増産現象」(即ち核酸効果)が発見¹⁾せられた事で、従来全く絶望視せられていた Streptolysin-S 問題の研究は一大急進展を来し、内外学者²⁻⁵⁾の精緻なる研究と相俟つて、今や Streptolysin-S 問題の全面的解決を見るに至ると共に⁶⁾、核酸効果は Ribo-核酸の持つ特性的生物学的機能の表示として核酸の機能、代謝、構造の追究に利用し得る好個・重要な手段となつてきたのである。

而して、嚮に核酸効果に及ぼす諸他薬物の影響に関しての考查で伊藤等⁷⁾が 2,2'-Dihydroxyazobenzene 並に其の Tetrabromo-誘導体が 1:10,000,000 (0.17/cc) の高稀釈度でも尙核酸

効果に対し顕著な抑制作用を発揮する事を見出し、又早野⁸⁾は Chloramphenicol, Terramycin 及び Aureomycin 等のリケッチヤ並に或る種のヴィールス性疾患に対する抗生物質が微量(夫々 8γ/cc, 0.24-0.5γ/cc 及び 0.08-0.25γ/cc)でよく Streptolysin-S 産生に抑圧効果を呈するというヴィールスの核蛋白性に関聯せしめて甚だ興味ある実証を齎したが、此両研究は化学物質中には溶連菌の Ribo-核酸に対する代謝機構に著大に影響して Streptolysin-S 産生(恐らく溶血性核酸への転化)を不能ならしめる物質の存在する事を明示したものとして甚だ重要といえよう。

処で前記伊藤等の研究では Dihydroxyazoben-

* Ito et al. : The inhibition of the production of hemolytic toxin of streptococcus pyogenes by o:o'-dihydroxyazobenzene and a related compound (Japan. Med. J., 1, No. 3, 260, 1948.) を第1報とす。尙本研究は一部日本抗生物質学術協議会研究費で行われた事を追記す。

ene 系物質*として單に 2,2'-Dihydroxyazobenzene 及び 2,2'-Dihydroxy-3,3',5,5'-tetrabromoazobenzene 並に 4,4'-Dihydroxyazobenzene の3つが考査されているに過ぎず、未だ Dihydroxyazobenzene 型の化学構造を具有する諸他化合物の Streptolysin-S 産生に及ぼす影響の追

究が行われていないので、私は今回此方面の考査研究を更に拡大深化せしめ、以つて此種系統の物質に於ける化学構造と Streptolysin-S 産生に対する抑制作用との關係に就いて知見を得んとして本研究を企てたのである。

実験方法

伊藤等の方法⁷⁾に準じたのであるが、溶連菌の核酸加ブイオン培養から遠心沈澱せしめた生菌体を直ちに磷酸緩衝-Ringer 液に浮游せしめた菌浮游液を使用する方が、生菌体に対し数回の洗滌操作を施すよりも、毎度恒定した Streptolysin-S 産生成績を示す事を知つたので、此の点に多少の工夫を加えた。

即ち実験術式は次の様である：

1) 菌株。——

教室保存の *Streptococcus haemolyticus* 'S-株' (マウスに対する最少致死量=1:100 Mill, 0.5cc) を使用。

2) 磷酸緩衝 Ringer 液。——

M/15 磷酸緩衝液 (pH=7.2) 1部を Ringer 液 4部に加えたもの。

3) 10%核酸原液。——

酵母核酸ソーダ "Merck" 2g を蒸留水 20cc に溶解した後 10% Na_2CO_3 溶液で中和した中性溶液。

4) 菌浮游液。——

溶連菌を普通ブイオン (pH=7.5) 200cc に移植、37°C に 20時間培養したものを遠心沈澱に附し、上清液を除去、管底の生菌体に対し磷酸緩衝液 10cc を注加して混和浮游せしめたもの。菌浮游液は毎常実験の都度新たに調製した。

5) 静菌状態溶連菌の Streptolysin-S 産生能に及ぼす諸他物質の影響の試験。——

a) [溶連菌生菌体浮游液 1cc+10% 核酸原液

0.2cc+ 被検物質溶液 0.2cc+ 磷酸緩衝-Ringer 液0.6cc] と、

b) [溶連菌生菌体浮游液 1cc+10% 核酸原液 0.2cc+蒸留水 0.2cc+磷酸緩衝-Ringer 液 0.6cc] の混液 (対照)、

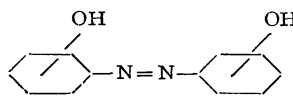
とを夫々調製、2時間 37°C の解凍中に静置せしめた後、遠心 (4,000 rpm, 10') によつて夫々の上清液を分取す。

6) 溶血試験。——

前記 a) 及び b) から得た夫々の上清液から型の如く、0.85%食塩水を以つて、1cc 宛の通下稀釈液列を作り、両列の試験管に対し一斉に 1%家兎赤血球浮游液 1cc 宛を加え、振盪後 37°C の解凍中に納め、2時間の後一旦成績を読み、後22時間水室に静置せしめて其の成績を記入す。

而して対照上清液と被検物質を加えた上清液との溶血力を相対比せしめて、被検物質の Streptolysin-S 産生に対する影響(抑制或は増強)如何を判定した。

7) 被検物質。——

 型の化学構造を有する物質の数は夥しく多数にのぼる訳であるが、本研究に於て考査の対象としたものは22種であり、此の外 Resorcinol, Phloroglucinol, L-Tyrosine 等の Coupler となつたもの10, 又 Coupler に導入するア

* 2,2'-Dihydroxyazobenzene 及び其の Tetrabromo-誘導体は当大学結核研究所に於て 1942年以来続行せられている o-Aminophenol を中心とする結核化学療法研究の当初に於て、已に其の抗菌性が試験されており、又伊藤等の研究以来此の両物質の生理作用に於ける当研究室に於ける検索は

1) 2,2'-Dihydroxyazobenzene は微弱ながら溶血作用を呈し、之を Tetrabromo-誘導体とする時は Saponin にも比肩し得る程の強力溶血性となる事の実証⁹⁾,

2) 2,2'-Dihydroxyazobenzene の一般薬理作用に関する研究¹⁰⁾, 及び

3) 2,2'-Dihydroxyazobenzene は陳旧ブイオン内では溶連菌に対し高度の菌發育阻止効果 (最少有効濃度=1:10,000,000) を發揮するが、新鮮ブイオン或は加熱した陳旧ブイオン内では全く無効力である事の実証¹¹⁾

等へと進んでいる。

ゾ基の母体となつたもの5, 更に細胞核機能に影響するとせられている物質5, 生体物質其の他9, 合計51種である(第III表参照)。

何れも原液として其の1:1,000水溶液(—OH 基を有

するアゾ系物質は計算量の N/10 NaOH を加え)を調製し, 此の原液から更に蒸留水を以つて所要濃度の稀釈液を作つた。

実験成績

第I表は 2,2'-Dihydroxy-3,3',5,5'-tetrabromoazobenzene(No.2) と此に匹敵する Streptolysin-S (以下單に S と略記す) 産生抑制効果を示す 6-(2'-Hydroxy-3',5'-dinitrophenylazo)-4-hexylresorcinol (No.8), 及び同じく 2,2'-Dihydroxyazobenzene 型構造を 具有していながら S 産生に対して何等抑圧作用を呈しない 1-(2'-Hydroxy-3',5'-dibromophenylazo)-2-naphthol-3,6-disulfonic acid (No.17), 更に Phenol の4物質に就いて同一条件下で行つた比較実験の成績を示したものである。

即ち, 先ず 対照実験では其の上清液は 1:5,000 稀釈迄溶血が起つてゐるに對し, 2,2'-Dihydroxy-3,3',5,5'-tetrabromoazobenzene 作用の実験では所見大いに趣の異なる事が注目されよう。即ち本物質の1億倍液作用の実験列では其の上清液の溶血力は対照のそれと同等であるが, 1千万倍液作用の実験列では既に S 産生抑制の徴が現われており(上清液の溶血限界濃度=1:2,000), 更に作用濃度が100万倍, 10万倍, 5万倍と大となるに従つて S 産生に対する抑制効果も亦強大に現われ, 5万倍液作用の実験列では上清液の 1:10 の稀釈で S の存在が検出し得ない。而して 6-(2'-Hydroxy-3',5'-dinitrophenylazo)-4-hexylresorcinol を以つての実験成績は又 2,2'-Dihydroxy-3,3',5,5'-tetrabromoazobenzene の場合と大体其の軌を一にしている処がある。

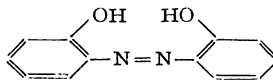
此に反して 1-(2'-Hydroxy-3',5'-dibromophenylazo)-2-naphthol-3,6-disulfonic acid 及び Phenol にあつては 2万倍液という高濃度作用の実験列でも上清液の溶血力は対照のそれと大差なく, 此の両物質は S 産生に対して殆ど抑制効果を發揮しないという成績である。

又第II表は 8 物質に就て, 其の10万倍の濃度での S 産生に及ぼす影響を試験して得た成績——茲では S 産生に対する 2,2'-Dihydroxy-3,3',5,5'-tetrabromoazobenzene の抑制効果を〔冊〕とし以下効果に〔冊〕,〔冊〕,〔冊〕と順次づけ, 全然無効(即ち何等薬物を作用せしめない対照実験の成績との間に殆ど差異が認められない)ものを〔—〕で表わしてある——を示したものである。

而して第III表は合計 51物質を以つての実験成績を総括展示したものであるが, 次に其の重要所見を摘記し併せて之に對し聊か考察を加える事とする:

A) 先ず化学構造と S 産生抑制効果との關係に就てであるが,

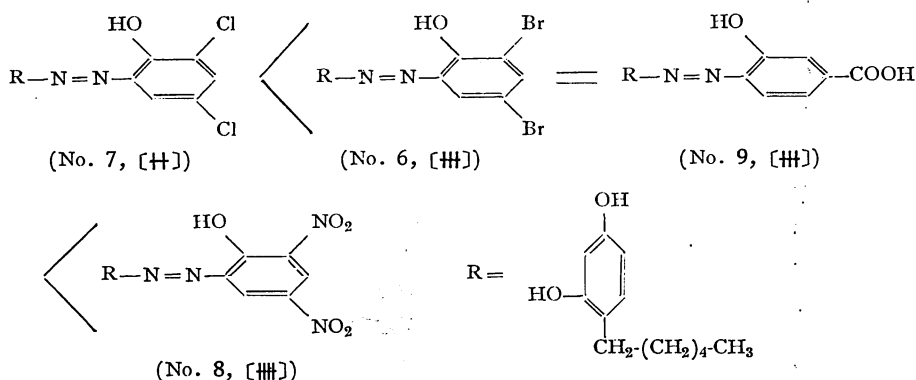
a) o-Aminophenol (No. 33) が軽度に有効〔+〕であるに對し, 2,2'-Dihydroxyazobenzene (No. 1) が有効〔冊〕であり, 又 L-Tyrosine (No.31) が無効〔—〕, 4,6-Dibromo-2-aminophenol (No.34) が弱有効〔+〕であるに對し, Bis-(2-hydroxy-3,5-dibromophenylazo)-L-tyrosine (No. 18) 及び 2,2'-Dihydroxy-3,3',5,5'-tetrabromoazobenzene (No. 2) が夫々〔冊〕及び〔冊〕程度に有効である事から

 の構造が S 産生に対する抑制効果發現上甚だ重要な意義を有していると思ふべきである。然し

b) 單に  型構造を有する物質でありさえすれば必ず効果的であるとは限らず, 導入されている他の側鎖の如何によつて S 産生抑制性が消長されている事が見ら

れるのである。即ち

1) $-SO_3H$ 基の導入されている 4,6-Bis-(2'-hydroxy-4',6'-dibromo-5'-sulfophenylazo)-phloroglucinol (No. 13), 2,4-Bis-(2'-hydroxy-4',6'-dibromo-5'-sulfophenylazo)-thymol (No. 15), 1-(2'-Hydroxy-4',6'-dibromo-5'-sulfophenylazo)-2-naphthol (No. 16), 1-(2'-Hydroxy-3',5'-dibromophenylazo)-2-naphthol-3,6-disulfonic acid (No. 17) 及び 2-(4'-Sulfophenylazo)-6-(2'-hydroxy-3',5'-dibromophenylazo)-4-hexylresorcinol (No. 10) は何れも全然無効〔-〕或は〔+〕程度である事は其の最顕著な事例であり、



等を夫々対比せしめても看取し得るのである。

c) 処で Bis-(2'-hydroxy-3',5'-dibromophenylazo)-L-tyrosine (No. 18, [++]) が有効, Bis-(p-arsophenylazo)-tyrosine (No. 19, [-]) が全然無効である事からいえば、如何にも ortho-位の $-OH$ 基が重要な意義を有しているやに思われるが、4,4'-Dihydroxyazobenzene (No. 21, [+]) 及び其の Tetrabromo-誘導体 (No. 22, [+++]) も夫々〔+〕及び〔+++〕程度の作用性があり、更に何等アゾ基を有していない Hexylresorcinol (No. 26, [++]), Picramic acid (No. 35, [++]), Thymol (No. 28, [+]) 及び 4,6-Dibromo-2-aminophenol (No. 34, [+]) にも亦或る程度の S 産生に対する抑制性がある事に

鑑みる時は 型構造の存在は S 産生に対する抑制性の発現上必須不

2) 其の他、軽度ではあるが此の様な事は又、

i) 2,2'-Dihydroxyazobenzene (No. 1, [+++]) と其の Tetrabromo-誘導体即ち 2,2'-Dihydroxy-3,3',5,5'-tetrabromoazobenzene (No. 2, [+++]),

ii) 4,6-Bis-(2'-hydroxy-3',5'-dibromophenylazo)-resorcinol (No. 3, [+++]) と之よりも $-OH$ 基が一つ多い 4,6-Bis-(2'-hydroxy-3',5'-dibromophenylazo)-phloroglucinol (No. 12, [+]), 及び

iii) Hexylresorcinol (No. 29, [+]) に於ける 4 つのアゾ誘導体、即ち

可欠の条件ではなくて、効果の増強に意義があると断じた方が妥当であろうか。

B) 次に Urethane (No. 38, [-]), Nitrogen mustard (No. 39, [-]), Nitromin (No. 40, [-]) 等の所謂制癌性物質、並に Colchicine (No. 42, [-]) 及び Trymon B (No. 41, [-]) 等の遺伝因子に影響するとせられる物質が何れも S 産生に対し何等影響(抑制・促進)する処がないという所見は、之等が Desoxyribo-核酸系に關聯した物質であり、S 産生は Ribo-核酸に關聯している事に想到するならば又見逃し難い処というべく、

C) 他方 Nicotinic acid amide (No. 43, [-]), PABA (No. 44, [-]), Thiochrome (No. 47, [-]) 等酵素、ビタミンに關係ある物質が何れも無効という事実も亦注目すべき処であろう。

論議は兎も角として S 産生(即ち核酸効果)に
対し、嚮に伊藤等によつて発見せられた 2,2'-
Dihydroxy-3,3',5,5'-tetrabromoazobenzene と同
等という強力な抑制効果を發揮する物質として
a) 6-(2'-Hydroxy-3',5'-dinitrophenylazo)-4-

hexylresorcinol (No. 8)

b) 6-(2'-Hydroxy-3',5'-dichlorophenylazo)-
4-ethylresorcinol (No. 5)

の 2 つを見出し得た事が今回の研究に於ける最大
收穫であると存する次第である。

結 論

本研究では 核酸加溶液中 静菌状態 溶連菌の
Streptolysin-S 産生能に及ぼす諸他の Dihydro-
oxyazobenzene 系誘導体並に之に類縁の化合物、
及び細胞核機能に影響するとせられている物質
等合計 51 種の 影響関係如何が 吟味検討 せられ
た。

而して之によつて、

1) 6-(2'-Hydroxy-3',5'-dinitrophenylazo)-4-
hexylresorcinol 及び 6-(2'-Hydroxy-3',5'-dichlo-
rophenylazo)-4-ethylresorcinol が 1 : 1,000,000
の高稀釈度 (17/cc) でも尚 S 産生に対し顕著な
抑制作用を發揮し、其の抑制力において 2,2'-
Dihydroxy-3,3',5,5'-tetrabromoazobenzene に匹

敵する事、及び

2) Nitrogen mustard, Nitromin, Urethane 等
の制癌性物質、及び Colchicine, Trymon B 等
の遺伝生化学上重視せられる物質が何れも無効
性である事

が実証せられ、他方

3) Dihydroxyazobenzene 型構造を有する諸他
の化合物に於て、其の化学構造と S 産生に対す
る抑制作用との関係に就て論考され種々興味あ
る知見が得られた。

種々御懇篤なる御教導を賜つた吉村政弘助教授に衷
心感謝の意を表します。

文 献

- 1) Okamoto, H.: Jap. J. Med. Sci., IV.
Pharmacology, 12, 168, 1940. 2) Hosoya,
S., Egami, F. et al.: Japan. J. Exp. Med.,
20, 25, 27, 1949; 20, 527, 1950. 3)
Bernheimer, A. W. et al.: J. Gen. Physiol.,
30, 339, 1947; J. Exp. Med., 88, 149, 1948;
90, 873, 1949; 92, 129, 1950; Bacter. Reviews,
12, 195, 1948. 4) Cinader, B., and
Pillemer, L.: J. Exp. Med., 92, 219, 1950.
5) Rosendal, K., and Bernheimer, A. W.:

- J. Immunol., 68, 53, 1952. 6) 岡本 肇:
核酸効果と之に基く Streptolysin-S 研究の展開.
細胞化学シンポジウム, 3, 143, 1954. 7)
Ito, R., Okami, T., Yoshimura, M., and
Sagara, S.: Jap. Med. J., 1, 260, 1948.
8) 早野: 日本細菌学雑誌, 7, 319, 1952.
9) 岡見富雄: 日本薬理学雑誌, 43, 116, 1948.
10) 藤田繁松: 日本薬理学雑誌, 44, 69, 1949.
11) 吉村政弘: 金大結研年報, 8(下), 71, 1950.

Summary

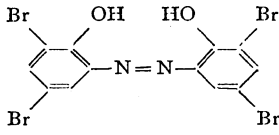
- 1) A number of structural relatives of dihydroxyazobezene series were tested for
their influence upon the production of streptolysin-S in the resting cell system,
and it was found that 6-(2'-hydroxy-3',5'-dinitrophenylazo)-4-hexylresorcinol
and 6-(2'-hydroxy-3',5'-dichlorophenylazo)-4-ethylresorcinol are very potent
in causing the inhibition of the production of streptolysin-S. Indeed, these two
azo-compounds were as powerful as 2,2'-dihydroxy-3,3',5,5'-tetrabromoazo-

- benzene, the potent efficacy of which was demonstrated by Ito et al in 1948.
- 2) Correlation between chemical constitution and inhibitory activity against the production of streptolysin-S by hemolytic streptococci was also discussed (cf. Table III).
- 3) Additional experiments carried out with urethane, nitrogen mustard, nitromin, 3-hydroxyanthranilic acid, colchicine, nicotinic acid amide, p-aminobenzoic acid, L-methionine, thiochrome, desoxyribonucleic acid and urea revealed that all these compounds were entirely ineffective.

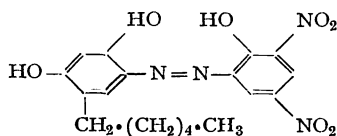
Table I.

Comparative experiments on the influence of 2,2'-dihydroxy-3,3',5,5'-tetrabromoazobenzene, 6-(2'-hydroxy-3',5'-dinitrophenylazo)-4-hexylresorcinol, 1-(2'-hydroxy-3',5'-dibromophenylazo)-2-naphthol-3,6-disulfonic acid and phenol upon the production of streptolysin-S in the resting cell system

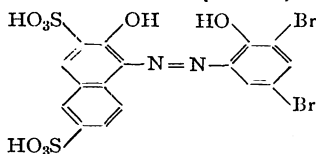
- a) A test-tube of following mixture was set : 1cc of a suspension of hemolytic streptococci, 0.2 cc of 10 per cent sodium yeast nucleate solution, 0.2 cc of a solution of chemical to be tested and 0.6cc of phosphate-buffered Ringer's solution (pH=7.1).
- b) A control test-tube contained a mixture of 1cc of a suspension of hemolytic streptococci, 0.2cc of 10 per cent sodium yeast nucleate solution, 0.2 cc of distilled water and 0.6 cc of phosphate-buffered Ringer's solution (pH=7.1).
The tubes were placed in an incubator at 37°C.
- c) After 2 hours incubation the content of each tube was centrifuged, and the clear supernatant obtained was tested for hemolytic activity.

Chemical tested	Experim. series	Concentration of chemical in the mixture	Reading taken after (hours)	Dilutions of supernatant										
				5	10	20	50	100	200	500	1,000	2,000	5,000	10,000
2,2'-Dihydroxy-3,3',5,5'- tetrabromoazobenzene (No. 2) <div></div>	I	1 : 50,000	2 24	- +	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -
	II	1 : 100,000	2 24	+++ +++	++ ++	++ ++	++ ++	++ ++	++ ++	++ ++	++ ++	++ ++	++ ++	- -
	III	1 : 1,000,000	2 24	+++ +++	+++ +++	+++ +++	+++ +++	+++ +++	+++ +++	+++ +++	+++ +++	+++ +++	+++ +++	- -
	IV	1 : 10,000,000	2 24	+++ +++	+++ +++	+++ +++	+++ +++	+++ +++	+++ +++	+++ +++	+++ +++	+++ +++	+++ +++	- -
	V	1 : 100,000,000	2 24	+++ +++	+++ +++	+++ +++	+++ +++	+++ +++	+++ +++	+++ +++	+++ +++	+++ +++	+++ +++	- -

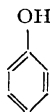
6-(2'-Hydroxy-3',5'-dinitrophenylazo)-4-hexylresorcinol
(No. 8)



1-(2'-Hydroxy-3',5'-dibromophenylazo)-2-naphthol-3,6-disulfonic acid (No. 17)



Phenol
(No. 51)



Control
(without chemical)

Notes : 1 cc of 1% washed rabbit's red cell suspension was added to 1 cc of the diluted supernatant. The tubes were incubated for 2 hours at 37°C, and then placed over-night in an ice-box.

‡‡‡ indicates complete hemolysis ;

‡‡, ‡ and + indicate partial hemolysis ;

— indicates no hemolysis.

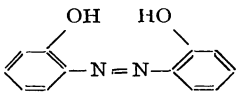
Table II.

Comparative hemolysis tests concerned with the influence of eight chemicals, in concentrations of 1:100,000, upon the production of streptolysin-S (Reading taken after 24 hours)

No.	Chemical tested	Dilutions of supernatant										Control (without supernatant)	Inhibitory effect against streptolysin-S production
		1 : 5	1 : 10	1 : 20	1 : 50	1 : 100	1 : 200	1 : 500	1 : 1,000	1 : 2,000	1 : 5,000	1 : 10,000	
18	Bis-(2-hydroxy-3,5-dibromophenyl-azo)-L-tyrosine	###	###	###	###	###	###	+	-	-	-	-	[++]
19	Bis-(p-arsonophenyl-azo)-tyrosine	###	###	###	###	###	###	###	##	++	+	-	[-]
34	4,6-Dibromo-2-aminophenol	###	###	###	###	###	###	##	++	-	-	-	[+]
31	L-Tyrosine	###	###	###	###	###	###	###	##	++	+	-	[-]
37	p-Aminophenyl-arsenic acid	###	###	###	###	###	###	###	##	++	+	-	[-]
39	Nitrogen mustard HCl	###	###	###	###	###	###	###	##	++	+	-	[-]
42	Colchicine	###	###	###	###	###	###	###	##	++	+	-	[-]
2	2,2'-Dihydroxy-3,3',5,5'-tetra-bromazobenzene	###	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	[###]
•	Control (without chemical)	###	###	###	###	###	###	###	##	++	+	-	•

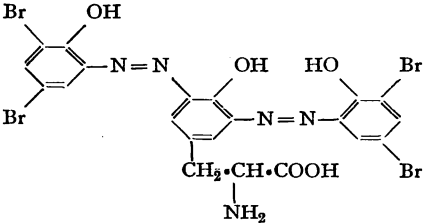
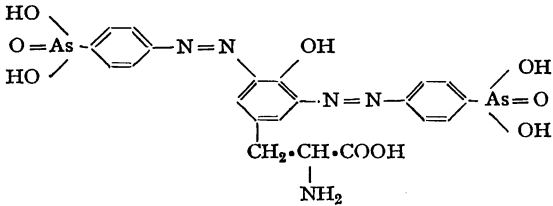
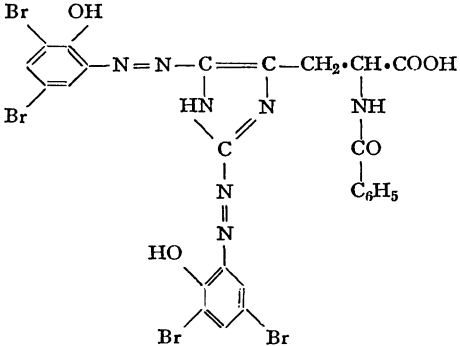
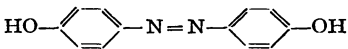
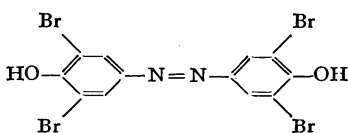
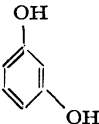
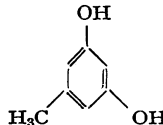
Table III.

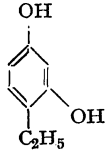
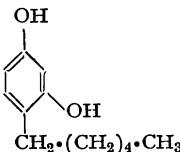
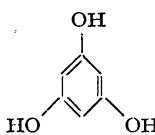
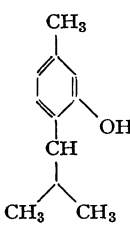
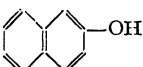
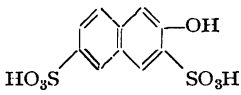
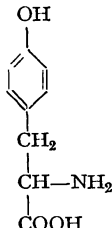
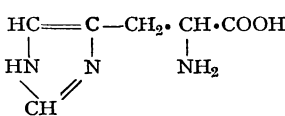
Summary of the experimental data concerned with the influence of 51 chemicals upon the production of streptolysin-S in the resting cell system

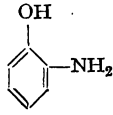
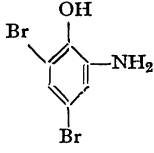
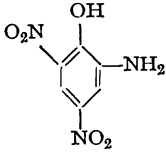
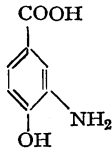
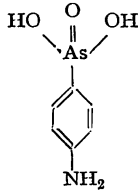
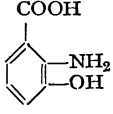
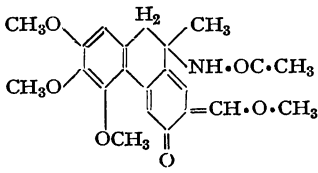
No.	Chemical tested	Formula	Inhibitory effect against streptolysin-S production*
1	2,2'-Dihydroxyazo-benzene		[###]

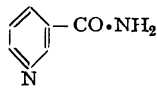
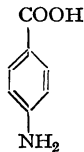
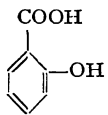
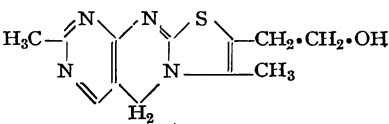
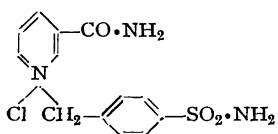
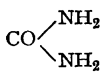
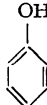
2	2,2'-Dihydroxy-3,3',5,5'-tetra-bromoazobenzene		[###]
3	4,6-Bis-(2'-hydroxy-3',5'-dibromophenylazo)-resorcinol		[##]
4	4,6-Bis-(2'-hydroxy-3',5'-dibromophenylazo)-5-methylresorcinol		[+]
5	6-(2'-Hydroxy-3',5'-dichlorophenylazo)-4-ethylresorcinol		[###]
6	6-(2'-Hydroxy-3',5'-dibromophenylazo)-4-hexylresorcinol		[##]
7	6-(2'-Hydroxy-3',5'-dichlorophenylazo)-4-hexylresorcinol		[+]
8	6-(2'-Hydroxy-3',5'-dinitrophenylazo)-4-hexylresorcinol		[###]
9	6-(2'-Hydroxy-4'-carboxyphenylazo)-4-hexylresorcinol		[##]
10	2-(4'-Sulfohenylazo)-6-(2'-hydroxy-3',5'-dibromophenylazo)-4-hexylresorcinol		[+]

11	6-(2'-Hydroxy-3',5'-dibromophenylazo)-phloroglucinol		[+]
12	4,6-Bis-(2'-hydroxy-3',5'-dibromophenylazo)-phloroglucinol		[+]
13	4,6-Bis-(2'-hydroxy-4',6'-dibromo-5'-sulfo-phenylazo)-phloroglucinol		[-]
14	2,4-Bis-(2'-hydroxy-3',5'-dibromophenylazo)-thymol		[+]
15	2,4-Bis-(2'-hydroxy-4',6'-dibromo-5'-sulfo-phenylazo)-thymol		[-]
16	1-(2'-Hydroxy-4',6'-dibromo-5'-sulfo-phenylazo)-2-naphthol		[-]
17	1-(2'-Hydroxy-3',5'-dibromophenylazo)-2-naphthol-3,6-disulfonic acid		[-]

18	Bis-(2-hydroxy-3,5-dibromophenylazo)-L-tyrosine		[+]
19	Bis-(p-arsonophenylazo)-tyrosine		[-]
20	Bis-(2-hydroxy-3,5-dibromophenylazo)-N ^a -benzoyl-L-histidine		[+]
21	4,4'-Dihydroxyazobenzene		[+]
22	4,4'-Dihydroxy-3,3',5,5'-tetrabromoazobenzene		[+++]
23	Resorcinol		[-]
24	5-Methylresorcinol (Orcinol)		[-]

25	4-Ethylresorcinol		[—]
26	Hexylresorcinol		[+]
27	Phloroglucinol		[—]
28	3-Methyl-6-iso-propylphenol (Thymol)		[+]
29	β-Naphthol		[—]
30	2-Naphtol-3,6-disulfonic acid		[—]
31	L-Tyrosine		[—]
32	L-Histidine		[—]

33	o-Aminophenol		[+]
34	4,6-Dibromo-2-aminophenol		[+]
35	Picramic acid		[++]
36	4-Hydroxy-3-amino-benzoic acid		[-]
37	p-Aminophenylarsenic acid		[-]
38	Urethane	$\text{H}_2\text{N} \cdot \text{COOC}_2\text{H}_5$	[-]
35	Nitrogen mustard	$\text{CH}_3 \cdot \text{N} \begin{cases} \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{Cl} \\ \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{Cl} \end{cases} \cdot \text{HCl}$	[-]
40	Nitromin	$\text{CH}_3 \cdot \text{N} \begin{cases} \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{Cl} \\ \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{Cl} \end{cases} \cdot \text{HCl}$ ↓ O	[-]
41	3-Hydroxyanthranilic acid (Trymon B)		[-]
42	Colchicine		[-]

43	Nicotinic acid amide		[—]
44	p-Aminobenzoic acid (PABA)		[—]
45	Salicylic acid		[—]
46	L-Methionine	$\text{CH}_3 \cdot \text{S} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \underset{\text{NH}_2}{\text{CH}} \cdot \text{COOH}$	[—]
47	Thiochrome		[—]
48	Desoxyribonucleic acid (Sodium salt)	$\text{C}_{38}\text{H}_{46}\text{O}_{25}\text{N}_{15}\text{P}_4\text{Na}_4$	[—]
49	p-Sulfamoyl- benzylpyridinium-3- carbamide chloride		[—]
50	Urea		[—]
51	Phenol		[—]

* The inhibitory effect of chemical on the production of streptolysin-S was graded as follows :

‡‡‡ =The chemical was proved to be as effective as 2,2'-dihydroxy-3,3',5,5'-tetrabromoazo-benzene.

‡‡, ‡‡ =The inhibitory effectiveness falls between ‡‡‡ and ‡‡.

‡ =The chemical, in concentrations of 1 : 20,000~1 : 100,000, was found to be slightly effective.

— =The chemical was found to be almost ineffective in concentrations of 1 : 20,000~1 : 100,000.